

Effect of vitamin E on glutathione-dependent enzymes

Citation for published version (APA):

van Haaften, R. I. M. (2003). *Effect of vitamin E on glutathione-dependent enzymes*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20030625rh>

Document status and date:

Published: 01/01/2003

DOI:

[10.26481/dis.20030625rh](https://doi.org/10.26481/dis.20030625rh)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary and General discussion

The human body has several lines of defence, e.g. antioxidants, enzymes and metal chelators, to cope with reactive oxygen species and electrophiles. Antioxidants do not work in isolation but form an intricate network. This thesis focuses on the interaction of two different defence mechanisms: vitamin E and glutathione-dependent enzymes. Specifically the interplay between vitamin E or α -tocopherol quinone and free radical reductase; the reduction of α -tocopherol quinone by glutathione; and the effect of different forms of vitamin E on glutathione S-transferase activity is explored.

In *chapter 2* of this thesis an overview on vitamin E and glutathione (-dependent enzymes) is presented. Together with other antioxidants (enzymatic and nonenzymatic) these two compounds form a barrier against damaging species. The uptake of the different forms of vitamin E and of glutathione is discussed and the different functions of vitamin E and glutathione (-dependent enzymes) are reported.

Radicals are able to oxidise polyunsaturated fatty acids in the membranes of cells. Products which are formed during this process can inhibit cell growth and display genotoxic activity. Vitamin E can inhibit this process of lipid peroxidation by scavenging lipid peroxyl radicals that propagate chains in nonenzymatic lipid peroxidation [1]. α -Tocopherol is the form of vitamin E mostly present in the human body due to the presence of α -tocopherol transfer protein in the liver which selectively sorts out RRR- α -tocopherol for uptake in the body [2]. Because of the higher bioavailability of α -tocopherol compared to all other vitamin E vitamers its antioxidant effect is superior to the other vitamin E vitamers in the defence against lipid peroxidation. It should be realised that once α -tocopherol scavenges the lipid peroxidation radical, it becomes a radical itself.

Next to α -tocopherol, GSH is also a potent inhibitor of lipid peroxidation. The GSH-dependent protection is vitamin E dependent and proceeds via a free radical reductase, an enzyme which is able to regenerate α -tocopherol radical to α -tocopherol. However not all α -tocopherol radicals are regenerated in this way, some radicals are oxidised further and form α -tocopherol quinone. It has been demonstrated that α -tocopherol quinone can be reduced to α -tocopherol in humans [3]. However, this reduction is not due to a direct reaction with GSH (*chapter 3*). The reduction does occur neither directly in solution nor in microsomes in which the free radical reductase enzyme is present. *Chapter 3* deals also with the interaction of α -tocopherol and α -tocopherol quinone with glutathione in the process of lipid peroxidation. As described in earlier studies, α -tocopherol inhibits the process of lipid peroxidation

via GSH-dependent protection. α -Tocopherol quinone does not affect this GSH-dependent protection in the presence of adequate levels of α -tocopherol. However, when α -tocopherol levels are reduced, α -tocopherol quinone completely blocks the GSH-dependent protection against lipid peroxidation.

This indicates that α -tocopherol quinone acts as a weak α -tocopherol antagonist for the free radical reductase. In this way α -tocopherol quinone can work as a pro-oxidant when α -tocopherol levels are low.

Glutathione S-transferases also protect the human body against damaging activities of, for instance, reactive oxygen species and various electrophiles. They catalyse the glutathione conjugation of various compounds [4]. The pi isoform of GST is especially vulnerable to oxidative stress [5]. Since α -tocopherol is able to protect against radicals, it was expected that it would have a protective effect on GST P1-1. In *chapter 4* it was demonstrated, however, that α -tocopherol is a very potent inhibitor of GST P1-1 compared with other known inhibitors of GST P1-1, i.e. S-hexylglutathione and bromosulfothalein [6]. α -Tocopherol does not compete for the binding sites of either GSH or CDNB on GST P1-1; it inhibits the activity in a noncompetitive manner.

When vitamin E is used as supplement or is added to a product, e.g. cosmetic product, the molecule is frequently made less vulnerable to oxidation by sequestration of the hydroxyl group in the chroman head, that is essential for its antioxidant function [7]. *Chapter 5* describes the effect of some tocopherol derivatives on activity of GST P1-1. Although sequestration of the free hydroxyl group in tocopherol lowers the capacity to inhibit GST P1-1, all tested tocopherols and tocopherol derivatives inhibit human GST P1-1 in a concentration-dependent manner at relatively low concentrations. The water-soluble vitamin E analogue trolox, with the same chroman head as α -tocopherol, has a poor inhibitory effect on GST P1-1. Also arachidonic acid, a long fatty acid resembling the tail of α -tocopherol, does not have a high inhibiting effect on GST P1-1. The inhibition of the ester RRR- α -tocopherol acetate was noncompetitive, indicating that the type of inhibition of the esters is identical to that of the free tocopherols. Based on these results it can be concluded that not just the tail or the head of tocopherol is important for GST P1-1 inhibition, but a combination of the head and the tail of the molecule. It also can be concluded that other structural elements play a role in GST P1-1 inhibition than in free radical scavenging. *Chapter 5* also describes the most probable mechanism of GST inhibition by tocopherols and tocopherol derivatives. The hypothesis is that these compounds induce conformational changes of the enzyme due to structural modifications of lipophilic regions present in the interface between the two monomers of GST. Binding of a compound to this region can change the activity of the enzyme [8].

In *chapter 6* the inhibition of GST P1-1 by tocotrienols is described. Tocotrienols inhibit GST P1-1 activity with comparable potency to that of tocopherols. The inhibition was also non-competitive with respect to both substrates CDNB and GSH. The hypothesis for the mechanism of GST inhibition by tocopherols and tocopherol derivatives described in *chapter 5* is verified in *chapter 6*. Three-dimensional evaluation of the GST P1-1 protein structure revealed that there are surprisingly few lipophilic amino acids present in the contact region of the two monomers. Binding of tocopherol, tocotrienol or tocopherol derivatives in this region is very unlikely. However, a very hydrophobic pit-like structure, where the lipophilic tail of tocopherols and tocotrienols could fit in, is present just below the G-site in the molecule. It is likely that tocopherols and tocotrienols preferentially bind to this region and in this way change the conformation of the enzyme. The activity of the enzyme will be inhibited in this way. The region described in this chapter contains overlapping regions with a hydrophobic binding region described in earlier studies [9-11].

GST is a superfamily of multiple isoenzymes. The three major cytosolic isoenzymes are alpha, mu and pi. The alpha and mu class isoenzymes are predominantly expressed in the liver and the kidney and the pi isoenzyme in the skin and red blood cells. In *chapter 7* we discussed the effects of RRR- α -tocopherol on the activity of purified isoenzymes of GST. Also the effects of RRR- α -tocopherol on GST activity in human liver cytosol and human red blood cell lysate are discussed. All the purified isoenzymes tested (GST A1-1, A2-2, M1a-1a and P1-1) are inhibited, in a concentration-dependent manner, by RRR- α -tocopherol. GST P1-1 is inhibited with the highest potency. The IC_{50} of GST A1-1 and GST M1a-1a are higher compared to GST P1-1; the IC_{50} of GST A2-2 is the highest of all isoenzymes tested.

It also appeared that RRR- α -tocopherol inhibits GST activity in human tissues containing different isoforms of the enzyme. This inhibition by RRR- α -tocopherol is also concentration-dependent. The IC_{50} value for GST P, present in lysate of human erythrocytes is much lower compared to the IC_{50} value for the mixture of GST M and GST A, present in human liver cytosol. These results are in accordance with the results of the purified isoenzymes. However, the absolute IC_{50} values are higher for the human sources of the isoenzymes compared to these values for purified isoenzymes. A possible explanation for this difference in IC_{50} values is that the potency of RRR- α -tocopherol to inhibit GST activity is drastically reduced when proteins, e.g. albumin or hemoglobin are present. Probably RRR- α -tocopherol binds to the protein with higher affinity than to the GST enzyme.

As already mentioned, GST P1-1 is especially vulnerable to oxidative stress. It is known that GST P1-1 is inactivated in human erythrocytes by H_2O_2 [12]. Numerous

reactive oxygen species are known to be more reactive than the relative stable H_2O_2 . HOCl is a powerful oxidant generated by the neutrophil enzyme myeloperoxidase from H_2O_2 and chloride ions. It is highly reactive towards a range of biological substrates [13]. In *chapter 8* the effect of this highly reactive oxygen species, HOCl, on GST P1-1 activity is presented. The results show that GST P1-1 is inhibited by HOCl with a very high potency compared to H_2O_2 . The inhibition of GST P1-1 by HOCl is concentration-dependent, noncompetitive and not reversible by GSH. It was also shown that the HOCl scavenger, lipoic acid, can protect against the inactivation of GST P1-1 by HOCl. Human GST P1-1 contains four cysteine residues of which two, cys-47 and cys-101, are critical for the activity [6]. Probably HOCl inhibits the activity of the enzyme by oxidation of such a cysteine residue, because it is known that HOCl shows high reactivity towards thiol groups [14, 15]. To inhibit GST in lysate of human erythrocytes (major form of GST is GST P1-1), higher concentrations of HOCl are needed to inhibit the enzyme compared with purified GST P1-1. This can be explained by the presence of GSH and thiol containing proteins that also can react with HOCl.

Implications

The effects of multiple forms of vitamin E on GSH-dependent enzymes can have numerous implications, which can be advantageous or disadvantageous for humans. As described in *chapter 3*, α -tocopherol quinone can act as a pro-oxidant in the GSH-dependent protection against lipid peroxidation, in conditions where the α -tocopherol concentration is low. Another disadvantageous effect of α -tocopherol is the indirect carcinogenic action performed by inhibition of GST P1-1 activity (*chapter 4*). In addition to the use of vitamin E as food ingredient or a supplement, several modern cosmetic products contain relatively high concentrations vitamin E. It is known that GST P1-1 is present in human skin [16]. In view of this it is of importance that mice lacking the GST P1-1 have an increased risk for skin tumorigenesis [17] and that vitamin E has been shown to be a complete tumour promoter in mouse skin [18]. The potent GST P1-1 inhibition by α -tocopherol found in our study (*chapter 4*) suggests that this promoter effect might be caused by GST P1-1 inhibition. Most cosmetic products contain vitamin E in an esterified form of tocopherol. These esterified products are also potent inhibitors of GST P1-1. Also tocotrienols can indirectly be carcinogenic compounds in this way (*chapter 6*).

Chapter 5 describes a risk assessment for dermal application of vitamin E containing products. Based on the assumptions made, it can be concluded that to reach a concentration of 10 μ M of the esterified vitamin E vitamer in the epidermis, a concen-

tration inhibiting GST P1-1 more than 50%, 0.0005% w/v tocopherol ester in the product would be sufficient. In cosmetic products up to 1% vitamin E can be found. This indicates that application of such a vitamin E containing product to the skin probably results in a substantial inhibition of GST P1-1, with possible disadvantageous effects.

In some cases the inhibition of GST can however be advantageous (*chapter 7/8*). Tumour cells express certain isoenzymes, especially GST P1-1, which contributes to resistance against cytostatic drugs through GSH conjugation of the active metabolites [19, 20]. Inhibition of GST activity can increase the potency of chemotherapeutics. Therefore, compounds are being developed that inhibit GST activity and can be used as adjuvant in cancer therapy. Possibly, vitamin E can be useful as inhibitor of glutathione conjugation in cancer therapy.

It is also known that GST P1-1 functions as a guardian of JNK in normally growing cells. GST P1-1 may serve as a sensor of intramolecular changes in redox potential that are elicited by various forms of stress [21]. *Chapter 8* shows that HOCl can inhibit GST P1-1 activity, what makes HOCl such a form of stress. These forms of stress alter the conformation of GST P1-1 which triggers the phosphorylation of Jun by JNK. This can result in changes in cell cycle, DNA repair or apoptosis. Overphosphorylation of Jun can increase cell proliferation and eventually apoptosis (*chapter 2/8*). Inhibition of GST P1-1 by vitamers of vitamin E also gives conformational changes in the GST molecule (*chapter 6*), albeit other changes than the changes induced by HOCl. Probably vitamin E also can act as guardian of JNK.

Samenvatting

Het menselijk lichaam heeft verschillende enzymatische en niet-enzymatische beschermingsmechanismen om het hoofd te kunnen bieden aan reactieve zuurstof deeltjes en elektrofielen. De niet-enzymatische antioxidanten werken niet alleen, maar vormen een ingewikkeld netwerk. Ook werken ze in samenhang met de enzymatische beschermingsmechanismen. Dit proefschrift concentreert zich op de interactie tussen twee verschillende beschermingsmechanismen: vitamine E en glutathion-afhankelijke enzymen. Met name de interactie tussen vitamine E, of α -tocoferol quinon, en vrij radicaal reductase; de reductie van α -tocoferol quinon door glutathion; en het effect van verschillende vormen van vitamine E op glutathion S-transferase activiteit is onderzocht.

In *hoofdstuk 2* van dit proefschrift wordt een overzicht van vitamine E en glutathion (-afhankelijke enzymen) gegeven. Samen met andere enzymatische en non-enzymatische antioxidanten vormen deze twee componenten een barrière tegen schadelijke deeltjes. De opname van de verschillende vormen van vitamine E en glutathion wordt besproken en de verschillende functies van vitamine E en glutathion (-afhankelijke enzymen) zijn weergegeven.

Radicalen zijn in staat om meervoudig onverzadigde vetzuren in de membranen van cellen te oxideren. Producten die gevormd worden tijdens dit proces kunnen de celgroei remmen en genotoxische activiteit uitoefenen. Vitamine E kan dit proces van lipide peroxidatie remmen door het wegvangen van lipide peroxy radicalen die de kettingreactie van non-enzymatische lipide peroxidatie propageren. α -Tocoferol is de vorm van vitamine E die het meest aanwezig is in het menselijk lichaam door de aanwezigheid van α -tocoferol transfer eiwit in de lever, dat selectief RRR- α -tocoferol bindt voor opname in het lichaam. Door de hogere biologische beschikbaarheid van α -tocoferol in vergelijking met alle andere vitamine E vitameren, is het antioxidant effect in de bescherming tegen lipide peroxidatie van α -tocoferol superieur aan de andere vitamine E vitameren. Opgemerkt moet worden dat α -tocoferol zelf een radicaal wordt wanneer het een lipide peroxy radicaal wegvangt.

Naast α -tocoferol is ook GSH een potente remmer van lipide peroxidatie. De GSH-afhankelijke bescherming is vitamine E afhankelijk en verloopt via een vrij radicaal reductase; een enzym dat in staat is om α -tocoferol te regenereren uit α -tocoferol radicaal. Echter niet alle radicalen worden op deze manier geregenereerd, enkele radicalen oxideren verder en vormen α -tocoferol quinon. Het is aangetoond dat mensen α -tocoferol quinon kunnen reduceren naar α -tocoferol. Deze reductie is echter niet het gevolg van een directe reactie met GSH (*hoofdstuk 3*). De reductie

gebeurt niet rechtstreeks in oplossing en ook niet in lever microsomen waarin het vrij radicaal reductase enzym aanwezig is. In *hoofdstuk 3* wordt ook de interactie van α -tocoferol en α -tocoferol quinon met glutathion in het proces van lipide peroxidatie beschreven. Zoals besproken in eerdere studies remt α -tocoferol het proces van lipide peroxidatie via GSH-afhankelijke bescherming. α -Tocoferol quinon beïnvloedt deze GSH-afhankelijke bescherming niet in de aanwezigheid van adequate gehalten α -tocoferol. Wanneer het α -tocoferol gehalte echter is afgenomen, voorkomt α -tocoferol quinon de GSH-afhankelijke bescherming tegen lipide peroxidatie volledig. Dit suggereert dat α -tocoferol quinon werkt als een α -tocoferol antagonist voor het vrij radicaal reductase. Op deze manier kan, indien de α -tocoferol gehalten laag zijn, α -tocoferol quinon als een pro-oxidant werken.

Glutathion S-transferases beschermen het menselijk lichaam ook tegen schadelijke effecten van, bijvoorbeeld, reactieve zuurstof deeltjes en verschillende elektrofielen. Ze katalyseren de conjugatie van glutathion met verschillende componenten. De pi isovorm van GST is gevoelig voor oxidatieve schade. Aangezien α -tocoferol in staat is om de mens te beschermen tegen radicalen, werd verwacht dat α -tocoferol een beschermend effect zou hebben op GST P1-1. In *hoofdstuk 4* wordt echter aangetoond dat α -tocoferol, in vergelijking met andere bekende remmers van GST P1-1, zoals S-hexylglutathion en bromosulfothaleïne, een zeer potente remmer van GST P1-1 is. α -Tocoferol competeert niet voor de bindingsplaatsen van GSH of CDNB in GST P1-1, maar remt de activiteit op een non-competitieve manier.

Wanneer vitamine E wordt gebruikt als supplement of wordt toegevoegd aan een product (bijvoorbeeld een cosmetisch product) wordt het molecuul vaak minder gevoelig gemaakt voor oxidatie door afscherming van de hydroxyl groep in de chromaan groep. Deze groep is essentieel voor de antioxidant functie. *Hoofdstuk 5* beschrijft het effect van enkele tocoferol derivaten op de activiteit van GST P1-1. Hoewel afscherming van de vrije hydroxyl groep in tocoferol de capaciteit om GST P1-1 te remmen verlaagt, remmen alle geteste tocoferolen en tocoferol derivaten humaan GST P1-1 op een concentratie-afhankelijke manier bij relatief lage concentraties. Het wateroplosbare vitamine E analoog trolox, dat dezelfde chromaan groep heeft als α -tocoferol, heeft een geringe remming op GST P1-1. Het vetzuur, arachidonzuur, dat lijkt op de staart van α -tocoferol, heeft ook geen sterk remmend effect op GST P1-1. De remming van de ester RRR- α -tocoferol acetaat is non-competitief; hetgeen suggereert dat de remming van de esters op vergelijkbare wijze verloopt als die van de vrije tocoferolen. Gebaseerd op deze resultaten kan worden geconcludeerd dat niet alleen de phytyl staart of de chromaan groep van tocoferol, maar een combinatie van beide structuren in het molecuul, belangrijk is voor GST P1-1 remming. Ook kan worden geconcludeerd dat bij GST P1-1 remming andere moleculaire structuur kenmerken een rol spelen dan bij vrije radicaal scavenging.

In *hoofdstuk 5* wordt bovendien het meest waarschijnlijke mechanisme besproken van GST remming door tocoferolen en tocoferol derivaten. Onze hypothese is dat deze componenten een conformatie verandering van het enzym induceren ten gevolge van structurele modificaties van lipofiele regio's aanwezig in het raakvlak tussen de twee monomeren van GST. Binding van een component in deze regio kan de activiteit van het enzym veranderen.

Hoofdstuk 6 beschrijft de remming van GST P1-1 door tocotrienolen. Tocotrienolen remmen de GST P1-1 activiteit met vergelijkbare potentie als tocoferolen. De remming is ook non-competitief ten opzichte van allebei de substraten CDNB en GSH. De hypothese voor het remmingsmechanisme van GST door tocoferolen en tocotrienolen beschreven in *hoofdstuk 5* wordt in *hoofdstuk 6* geverifieerd. Driedimensionale evaluatie van de GST P1-1 eiwit structuur toont dat er verrassend weinig lipofiele aminozuren aanwezig zijn in de contact regio van de twee monomeren. Binding van tocoferol, tocotrienol of tocoferol derivaten in deze regio is zeer onwaarschijnlijk. Echter, onder de G-plek is een erg lipofiele put-achtige structuur aanwezig waar de lipofiele staart van tocoferolen en tocotrienolen in kan passen. Het is waarschijnlijk dat tocoferolen en tocotrienolen bij voorkeur binden aan deze regio en op deze manier de conformatie van het enzym veranderen. De activiteit van het enzym wordt waarschijnlijk op deze manier geremd. De locatie, voor binding van tocoferolen en tocotrienolen, die wordt beschreven in dit hoofdstuk is gedeeltelijk overlappend met een hydrofobe bindende regio zoals beschreven in eerdere studies.

GST is een superfamilie van meerdere isoenzymen. De drie meest belangrijke isoenzymen zijn alfa, mu en pi. De alfa en mu klasse isoenzymen worden voornamelijk tot expressie gebracht in de lever en de nier en het pi isoenzym in de huid en rode bloedcellen. In *hoofdstuk 7* worden de effecten van RRR- α -tocoferol op de activiteit van gezuiverde isoenzymen bediscussieerd. De effecten van RRR- α -tocoferol op de GST activiteit in humaan lever cytosol en lysaat van humane rode bloedcellen worden eveneens besproken. Alle geteste gezuiverde enzymen (GST A1-1, A2-2, M1a-1a en P1-1) worden op een concentratie-afhankelijke manier geremd door RRR- α -tocoferol. GST P1-1 wordt geremd met de grootste potentie. De IC_{50} waarden van GST A1-1 en GST M1a-1a zijn groter dan de IC_{50} waarde met GST P1-1. GST A2-2 vertoont de hoogste IC_{50} van alle geteste isoenzymen voor RRR- α -tocoferol.

De GST activiteit van humaan lever cytosol en humane rode bloedcellen, wordt ook geremd door RRR- α -tocoferol. Deze remming door RRR- α -tocoferol is eveneens concentratie-afhankelijk. De IC_{50} waarde voor GST P, aanwezig in lysaat van humane erythrocyten, is veel lager in vergelijking met de IC_{50} waarde voor het mengsel van GST M en GST A, aanwezig in humaan lever cytosol. Deze resultaten zijn in overeenstemming met de resultaten van gezuiverde isoenzymen. De absolute IC_{50} waarden

voor de isoenzymen aanwezig in lever cytosol en rode bloedcellen zijn echter hoger dan de waarden voor de gezuiverde enzymen. Een mogelijke verklaring voor deze verschillen in IC_{50} waarden is de aanwezigheid van eiwitten zoals albumine en hemoglobine, waardoor de effectiviteit van RRR- α -tocoferol om GST te remmen drastisch wordt gereduceerd. Waarschijnlijk bindt RRR- α -tocoferol met grotere affiniteit aan het eiwit dan aan GST.

Zoals al eerder opgemerkt, is GST P1-1 gevoelig voor oxidatieve schade. Het is bekend dat GST P1-1 in humane erythrocyten wordt geïnactiveerd door H_2O_2 . Er zijn verscheidene reactieve zuurstofdeeltjes bekend die reactiever zijn dan het relatief stabiele H_2O_2 . HOCl is een sterke oxidant die wordt gegenereerd uit H_2O_2 en chloride ionen door het enzym myeloperoxidase zoals dat voorkomt in neutrofielen. Het is zeer reactief tegen een aantal biologische substraten. In *hoofdstuk 8* wordt het effect van deze sterke oxidant, HOCl, op GST P1-1 activiteit weergegeven. De resultaten tonen dat GST P1-1 beter wordt geremd door HOCl dan door H_2O_2 . De remming van GST P1-1 door HOCl is concentratie-afhankelijk, non-competitief en niet reversibel door GSH. Er is ook aangetoond dat de HOCl scavenger liponinezuur, GST P1-1 kan beschermen tegen inactivatie door HOCl. Humaan GST bevat vier cysteine groepen waarvan er twee, *cys-47* en *cys-101*, essentieel zijn voor de activiteit. Waarschijnlijk remt HOCl de activiteit van het enzym door oxidatie van zo'n cysteine groep, aangezien het bekend is dat HOCl erg reactief is richting thiol groepen. Om GST in lysaat van humane erythrocyten (de belangrijkste vorm van GST in erythrocyten is GST P1-1) te remmen zijn hogere concentraties HOCl nodig in vergelijking met gezuiverd GST P1-1. Dit kan worden verklaard door de aanwezigheid van GSH en thiol bevattende eiwitten die ook kunnen reageren met HOCl.

Implicaties

De effecten van de verschillende vormen van vitamine E op GSH-afhankelijke enzymen kunnen meerdere implicaties hebben.

Zoals beschreven in *hoofdstuk 3*, kan α -tocoferol quinon werken als een pro-oxidant in de GSH-afhankelijke bescherming tegen lipide peroxidatie, indien de α -tocoferol concentratie laag is. Een ander nadelig effect van α -tocoferol is de indirect carcinogene werking die kan optreden door remming van GST P1-1 activiteit (*hoofdstuk 4*). Naast het gebruik van vitamine E als voedingsingrediënt of als supplement, bevatten verscheidene moderne cosmetische producten relatief hoge concentraties vitamine E. Bekend is dat GST P1-1 aanwezig is in de huid. Met het oog op deze punten is het van belang op te merken dat muizen zonder GST P1-1 een verhoogd risico hebben op het ontwikkelen van huidkanker en dat er is aangetoond dat vita-

mine E een tumor promoter kan zijn in de huid van de muis. De, in onze studie gevonden (*hoofdstuk 4*), potente GST P1-1 remming door α -tocoferol suggereert dat dit promoter effect veroorzaakt kan zijn door GST P1-1 remming. De meeste cosmetische producten bevatten vitamine E in de veresterde vorm van tocoferol. Deze veresterde producten zijn eveneens potente remmers van GST P1-1. Ook tocotrienolen kunnen op deze manier indirect carcinogeen werken (*hoofdstuk 6*).

In *hoofdstuk 5* wordt een risicoschatting beschreven voor dermale applicatie van vitamine E bevattende producten. Gebaseerd op de aannames, dat alle tocoferol de epidermis bereikt en dat de concentratie in de epidermis één tiende deel is van de concentratie in het cosmetische product, kan er worden geconcludeerd dat een concentratie van 0,0005% tocoferol ester in het product, genoeg kan zijn om een concentratie van 10 μ M (remt GST P1-1 met meer dan 50%) veresterd vitamine E in de epidermis te bereiken. In cosmetische producten kunnen concentraties tot 1% vitamine E worden gevonden. Dit indiceert dat applicatie van een vitamine E bevattend product op de huid waarschijnlijk kan resulteren in substantiële remming van GST P1-1, met mogelijk nadelige gevolgen.

In sommige gevallen kan echter de remming van GST ook voordelig zijn (*hoofdstuk 7/8*). Tumor cellen brengen bepaalde isoenzymen tot expressie, in het bijzonder GST P1-1. Dit leidt tot resistentie tegen cytostatica door GSH conjugatie met de actieve metabolieten. Remming van GST activiteit kan de effectiviteit van chemotherapeutica verhogen. Met dit doel worden stoffen ontwikkeld die GST remmen en gebruikt kunnen worden als toevoeging in kankertherapie.

Verder is bekend dat GST P1-1 kan werken als bewaker van c-Jun NH_2 -terminaal eiwit kinase (JNK) in normaal groeiende cellen. GST kan dienen als sensor voor intramoleculaire veranderingen in redox potentiaal die worden veroorzaakt door verschillende vormen van stress. Hoofdstuk 8 laat zien dat HOCl de GST P1-1 activiteit kan remmen. Hierdoor verandert waarschijnlijk de conformatie van GST P1-1 waardoor de fosforylatie van Jun door JNK wordt aangestuurd. Dit kan resulteren in veranderingen in cel cyclus, DNA herstel of apoptose. Overfosforylatie van Jun kan de cel proliferatie verhogen en uiteindelijk leiden tot apoptose (*hoofdstuk 2/8*). Remming van GST P1-1 door vitamine E vitameren geeft ook conformatie veranderingen in het GST molecuul (*hoofdstuk 6*), hoewel deze veranderingen anders zijn dan de veranderingen die worden geïnduceerd door HOCl. Waarschijnlijk kan vitamine E ook werken als bewaker van JNK.